

14.01.99 5

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 05 MAR 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 1月19日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第020112号

出 願 人

Applicant(s):

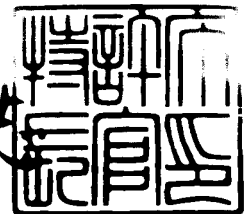
資酒造株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 2月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 建 志



出願番号 出願特平11-3007-25

【書類名】 特許願

【整理番号】 1-980116-1

【提出日】 平成10年 1月19日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光殿

【国際特許分類】 C07C 49/707
C07C 45/51

【発明の名称】 シクロペンテノンの製造方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 巽 容子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 小山 信人

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】

【識別番号】 100078503

【弁理士】

【氏名又は名称】 中本 宏

【代理人】

【識別番号】 100087022

【弁理士】

【氏名又は名称】 井上 昭

【代理人】

【識別番号】 100089428

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉嶺 桂

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705578

【書類名】 明細書

【発明の名称】 シクロペンテノンの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(a)～(d)から選択される少なくとも1種の物（但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体含有物を除く）を加熱処理することを特徴とする下記式（化1）で表される4，5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

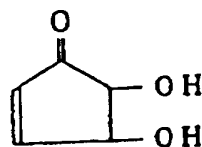
(a) ペントース

(b) ペントース含有物

(c) ペントース誘導体

(d) ペントース誘導体含有物

【化1】



【請求項2】 ペントースがリボース又はキシロースである請求項1記載の4，5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

【請求項3】 ペントース誘導体が、5位に負電荷をもちうる基が結合したペントース及び／又は5位に負電荷をもちうる基が結合したペントース誘導体である請求項1記載の4，5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

【請求項4】 負電荷をもちうる基がリン酸基又は硫酸基である請求項3記載の4，5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬用、食品及び飲料の分野で有用な、制がん作用等の生理活性を

有する 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、臨床上の療法に用いられている薬物はアルキル化剤、代謝阻害剤、植物アルカロイド等の制がん剤、抗生物質、免疫促進剤、免疫調節剤など多岐にわたっているが、これらの薬物療法はいまだ完成したとはいいがたい。

これらのうち、天然物由来であるプロスタグランジンの中で、5員環に α , β -不飽和カルボニルを有するプロスタグランジン A 及び J 類が DNA 合成を抑制することにより、安全性の高い制がん剤としての可能性が報告され、それらの各種誘導体が合成されている（特開昭 62-96438 号公報参照）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、制がん作用等の生理作用を有する 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

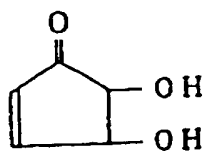
本発明を概説すれば本発明は下記 (a) ~ (d) から選択される少なくとも 1 種の物（但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体含有物を除く）を加熱処理することを特徴とする下記式（化 1）で表される 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法に関する。

(a) ペントース

(b) ペントース含有物

(c) ペントース誘導体

【化 1】



【0006】

本発明者らは式(化1)で表される化合物、すなわち4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン(以下、単にシクロペンテノンと称す)が、上記(a)~(d)から選択される少なくとも1種の物の加熱処理物中に生成し、必要に応じて、得られた加熱処理物中よりシクロペンテノンを単離できることを見出し本発明を完成した。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を具体的に説明する。

ペントースは炭素を5個持つ糖の総称であり、アルドペントースとしてはアラビノース、キシロース、リボース、リキソース等が、ケトペントースとしてはリブロース、キシルロース等が知られている。また、デオキシ糖としてはデオキシリボースが挙げられる。本発明で使用するペントースは、加熱処理によってシクロペンテノンを生成する物であれば限定はない。

ペントース誘導体としては、例えば以下の物が挙げられる。リボ核酸、リボヌクレオチド、リボヌクレオシドはリボースの誘導体であり、また、デオキシリボ核酸、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオシドはデオキシリボースの誘導体である。これらは補酵素として働いたり遺伝情報の保存及び発現を担っていたりして生物にとって極めて重要な物質である。リボース-5-リン酸、リブロース-5-リン酸、キシルロース-5-リン酸は各々リボース、リブロース、キシルロースの誘導体であり、ペントースリン酸回路の代謝中間体として広範囲の生物種に見出される。植物のゴム質、粘質物、ヘミセルロースや細菌の多糖はアラビノースやキシロースを含んでいるのでこれらのペントースの誘導体であり、ヒト心筋中のリキソフラビンやある種の抗生物質はリキソースの誘導体で

ある。

【0008】

5位に負電荷を持ちうる基が結合したペントース及び5位に負電荷を持ちうる基が結合したペントース誘導体も本発明で使用するペントース誘導体に含まれる。本発明において負電荷を持ちうる基とは、通常の化学反応が行われる条件、すなわち、pH1~13、0℃~200℃の少なくとも1個の条件において水溶液中で負電荷を持つ基であればよく、リン酸基、硫酸基が例示される。また、本明細書においてはこれらの塩、エステル、酸無水物も負電荷を持ちうる基に含まれる。但し、カルボキシル基は負電荷を持ちうる基であるが、5位にカルボキシル基を持つアルドペントースはウロン酸であるので本発明で使用するペントース誘導体からは除外される。

【0009】

本発明で 사용할 ことができる、5位に負電荷を持ちうる基が結合したペントースに特に限定はなく、加熱処理によりシクロペンテノン を生成する物はすべて本発明の誘導体に包含される。すなわち、加熱処理によりシクロペンテノン を生成すればそのペントースの種類、負電荷を持ちうる基の種類は問わない。5位に負電荷を持ちうる基が結合したペントースの例としてはリボース-5-リン酸、リボース-5-硫酸が挙げられる。

【0010】

本発明において、5位に負電荷を持ちうる基が結合したペントース誘導体とは、5位に負電荷を持ちうる基が結合したペントースを含有する化合物を意味し、それらは特に限定されるものでなく、例えば、リボ核酸、リボヌクレオチド、リボヌクレオシド、それらの化学的、酵素的、物理的処理物である、その分解物、分解物の誘導体、分解物の塩を使用することができる。

本発明では前記(1)〜(3)の誘導体(化学的、酵素的、物理的処理物である、その分解物、分解物の誘導体、分解物の塩)を使用することができる。前記の化学的処理方法としては、(1)糖類化合物を例として、(2)数秒〜数時間、(3)1〜100℃、(4)数秒〜数分、(5)加熱処理すれば良い。また前記の酵素的な処理方法としては、(1)糖類化合物を例として、(2)数秒〜数時間、(3)1〜100℃、(4)数秒〜数分、(5)加熱処理すれば良い。

理方法としては、ペントース誘導体に特異性を有する加水分解酵素による、ペントース誘導体の公知の分解が挙げられる。例えばリボ核酸の場合、各種リボヌクレアーゼが使用できる。更に前記の物理的な処理方法としては、原料化合物の近赤外線、赤外線、マイクロ波、超音波処理等が挙げられ、例えばリボ核酸を pH 中性又はアルカリ性の溶液中に入れ、温度は適宜、室温以上で、適宜還元下、例えばアスコルビン酸存在下で、時間は 1 秒以上、好ましくは 5 秒～1 時間の超音波処理をし、振動エネルギーを与えることが挙げられる。なお超音波以外にもマイクロ波、近赤外線、赤外線等の照射も有効で、これらを組合せ照射しても良い。照射は連続的に行っても良く、断続的に行っても良い。

【0012】

また本発明においてはペントース及び／又はペントース誘導体の含有物、例えば動植物組織、動植微生物細胞、同細胞抽出物、同細胞培養上清等も使用できる。これらをそのまま、あるいは乾燥、粉碎して用いても良く、またペントース及び／又はペントース誘導体の含有物を上記と同様の化学的、酵素的、物理的前処理を行って得られるペントース及び／又はペントース誘導体含有物の抽出液、該抽出液よりの精製物を使用しても良い。これらのペントース及び／又はペントース誘導体を含有する化合物の抽出液の調製方法、抽出液からの精製方法は公知の方法で行えば良く、特に限定はない。なお、本発明においてペントース及び／又はペントース誘導体からはウロン酸及び／又はウロン酸誘導体含有物が除かれる。ウロン酸誘導体とはウロン酸のラクトン、ウロン酸のエステル、ウロン酸のアミド、ウロン酸の塩等である。

【0013】

本発明に使用する加熱処理物の製造における加熱処理方法としては、シクロペンテノンが生成する条件であれば特に限定は無いが、下記 (a)～(d) から選択される少なくとも 1 種の物（但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体含有物を除く）を例えば 60～350℃で数秒～数日、好ましくは 80～150℃で数分～数日加熱処理すれば良く、リボース又はリボース-5-リン酸の場合、例えば 80～150℃で数分～数日の加熱処理を行うことにより、シクロペンテノンを有する加熱処理物を得ることができる。

- (a) ペントース
- (b) ペントース含有物
- (c) ペントース誘導体
- (d) ペントース誘導体含有物

加熱処理時のpHは特に限定はないが、中性から酸性下で行うのが好ましく、その原料に応じ加熱処理時のpHを調整すればよい。

【0014】

加熱処理時の原料の濃度はその加熱処理によりシクロペンテノンを生じうる範囲内であれば特に限定は無く、操作性、収率等の点を考慮し設定すれば良い。

本発明における加熱処理は湿式加熱でも、乾式加熱でも良い。湿式加熱としては、水蒸気加熱、水蒸気加圧加熱、加圧式加熱等任意の湿式加熱方法を用いることができる。乾式加熱としては、乾燥熱風による直接加熱法、熱源から隔壁を通して加熱する間接加熱法等が使用できる。直接加熱方法としては、気流乾熱法、噴霧乾熱法等があり、間接加熱法としてはドラム乾熱法等が使用できる。また本発明の加熱処理物の原料は通常の、煮る、焼く、炒る、煎じる、蒸す、炒める、揚げる等の任意の加熱方法で処理することができる。

【0015】

本発明において加熱処理物中のシクロペンテノンは抗菌作用を指標に精製、単離することができる。精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂、好ましくは陰イオン交換樹脂、活性炭等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、加熱処理物中に生成されたシクロペンテノンを精製、単離することができる。

例えば、リボースを使用し、その2M水溶液を121℃で14時間加熱処理す

る。溶媒を抽出し、抽出物を濃縮する。次に、濃縮物を、ゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、溶出するシクロペンテノン画分を濃縮し、濃縮物からシクロペンテノンを抽出し、抽出したシクロペンテノンを、加熱処理物中のシクロペンテノンが

単離される。

また上記リボース加熱処理物をイオン交換樹脂カラム、好ましくは陰イオン交換樹脂カラム処理し、非吸着性画分を集めることによりシクロペンテンオンが精製される。あるいは上記リボース加熱処理物を活性炭カラム処理し、非吸着画分の除去、カラムの洗浄を行った後、親水性有機溶媒、例えばエタノール水溶液、好ましくは40%以上のエタノール水溶液で溶出することにより、精製シクロペンテンオンを得ることができ、これらの方法を組合せることにより、更に高純度の精製シクロペンテンオンを得ることができる。

【0016】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定される物ではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

【0017】

参考例 1

(1) 10 g の D-グルクロン酸 (シグマ社製 G 5269) を 1 リットルの水に溶解し、121℃で4時間加熱した後約 10 ml になるまで減圧下濃縮した。これに酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 混合液の上層 40 ml を加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約 10 ml まで濃縮した。

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲル BW-300 SP (2 × 28 cm、富士シリシア化学社製) にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 の上層を溶離液としてコンプレッサーで 0.2 kg/cm² に加圧し、毎分 5 ml の流速で分離を行った。1 画分当り 10 ml になるようにフラクショネーションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ 61 番から 80 番までの画分に高純度のシクロペンテンオンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後 40 ml のクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって 100 mg のシクロペンテンオンを得た。

【0018】

(2) 参考例 1-(1) で得られたシクロペンテンオンの物性を下記に示す。なお

シクロペンテノンの質量分析はD X 3 0 2質量分析計（日本電子社製）を用いて行った。また、重クロロホルム溶媒を用いたNMRスペクトルの測定はJ N M - A 5 0 0（日本電子社製）を用いた。比旋光度はD I P - 3 7 0型旋光計（日本分光社製）、UV吸収スペクトルはU V - 2 5 0 0分光光度計（島津製作所社製）、赤外吸収スペクトル（I R）はF T I R - 8 0 0 0赤外分光光度計（島津製作所社製）をそれぞれ用い測定した。

FAB-MS m/z 115 $[M+H]^+$

マトリックスとしてグリセロールを用いた。

 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃)

84.20 (1H, d, J=2.4 Hz, 5-H)、4.83 (1H, m, 4-H)、6.30 (1H, dd, J=1.2, 6.1 Hz, 2-H)、7.48 (1H, dd, J=2.1, 6.1 Hz, 3-H)

但し、 $^1\text{H-NMR}$ の化学シフト値は CHCl_3 の化学シフト値を7.26 ppmとして表した。

旋光度： $[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ (\underline{c} 1.3、水)

IR (KBr法) : 3400、1715、1630、1115、1060、1025 cm^{-1} に吸収を有する。

UV : λ_{max} 215 nm (水)

この画分をパルパックタイプSカラムを用いた順相HPLCで分離し、215 nmの紫外線吸収で検出したところ、純度は98%であった。

【0019】

实施例 1

(1) 2M D-リボース (ナカライテスク社販売、302-10) 水溶液又は
2M D-(+)-キシロース (ナカライテスク社製、367-19) 水溶液を

37℃で30分間反応させた。こうして得られた加熱処理液及び加熱処理液のチロシン、トリプトファン、リジン、イソロイシン、フェニルアラニン、ヒスチジンの濃度は、それぞれ、

社製)

移動相A: 0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液

移動相B: 0.1%TFA、80%アセトニトリル水溶液

流速: 0.8 ml/分

溶出: 移動相A(5分間) → 移動相Aから移動相Bへの直線濃度勾配(20分間) → 移動相B(5分間)

検出: 215 nmにおける吸光度

試料注入量: 10 μ l

加熱処理液を分析した結果、リボースとキシロースのいずれにおいても保持時間6.5分のピークが見られた。これは参考例1-(1)で得たシクロペンテノンの保持時間と一致する。

加熱処理液のチオフェノール反応物を分析した結果、リボースとキシロースのいずれにおいても保持時間6.5分のピークが消滅し、新たに保持時間19.6分のピークが出現した。新たに出現したピークは、参考例1-(1)で得たシクロペンテノンをチオフェノールと反応させたときに生ずるピークと一致する。

以上より、リボース又はキシロースを加熱することによりシクロペンテノンが生成することが明らかになった。

【0020】

(2) 0.1M、0.2M、0.5M、1M又は2Mの、D-リボース又はD-(+)-キシロース水溶液を各々121℃で14時間加熱した。実施例1-(1)と同様の逆相HPLCで分析し、保持時間6.5分のピークの高さを測定し、シクロペンテノン生成量を測定した。その結果を図1に示す。すなわち図1はペントースの濃度とシクロペンテノン生成量との関係を示す図であり、横軸はペントース濃度(M)を、縦軸はシクロペンテノン生成量(μ g)を示す。なお、図1において黒丸印はD-リボース加熱処理物中のシクロペンテノン生成量を、黒三角印はD-(+)-キシロース加熱処理物中のシクロペンテノン生成量を示す。

【0021】

実施例2

50mgのリボース-5-リン酸ナトリウム（ナカライテスク社製、302-12）を5mlの水に溶解し、HClでpH3に調整した後、121℃で4時間加熱した。上記加熱物を以下の逆相HPLCで分析した。

カラム：TSK gel ODS-80Ts（4.6mm×250mm、東ソー社製）

移動相：TFA水溶液

流速：1ml/分

検出：215nmにおける吸光度

試料注入量：20μl

その結果、保持時間4.7分のピークが見られ、参考例1-(1)で得た精製シクロペンテノンの保持時間と一致した。また、該精製シクロペンテノンを用いて得られたシクロペンテノンとピーク面積の関係を示す検量線から、本加熱物中のシクロペンテノン濃度は6.3μg/mlと算出された。

上記と同様に本加熱物200μlのHPLCを行い、保持時間3.8～5.8分の画分を分取した。同様の操作を2回行い、分取した画分を減圧下濃縮、乾固した。これにN,O-ビス（トリメチルシリル）-アセトアミド（ナカライテスク社製）：トリメチルクロロシラン（ジーエルサイエンス社製）：ピリジン（ピラス社製）=4:1:1の混合液を加えてトリメチルシリル化し、DX-302質量分析計（日本電子社製）を用いてガスクロマトグラフィー/質量分析法で構造を解析した結果、参考例1-(1)で得た精製シクロペンテノンと同じ保持時間に現れるピークの質量スペクトルは該精製シクロペンテノンのそれと一致した。よってシクロペンテノンの生成が確認された。

【0022】

30mgのリボース-5-リン酸ナトリウムを3mlの水に溶解し、1N H

カラム：TSK-gel G2500PW (XL) (7.8×300mm、東ソ

社製

温度：30℃

移動相：水

流速：1 ml / 分

検出：215 nmにおける吸光度

その結果、保持時間 11.4 分のピークが見られ、参考例 1-(1) で得た精製シクロペンテノンの保持時間と一致した。また、該精製シクロペンテノンを用いて得られたシクロペンテノンとピーク面積の関係を示す検量線から、本加熱物中のシクロペンテノン濃度は $8.9 \mu\text{g/ml}$ と算出された。

以上より、リボース-5-リン酸ナトリウムを加熱することにより、シクロペンテノンが生成することが明らかになった。

【0023】

【発明の効果】

本発明によりペントース、ペントース誘導体、ペントース及び／又はペントース誘導体含有物を用いるシクロペンテノンの製造方法が提供される。本発明により得られるシクロペンテノンは制がん作用、アポトーシス誘発作用、抗菌作用等の生理活性を有し、医薬品として、また、食品保存剤等として有用である。

【図面の簡単な説明】

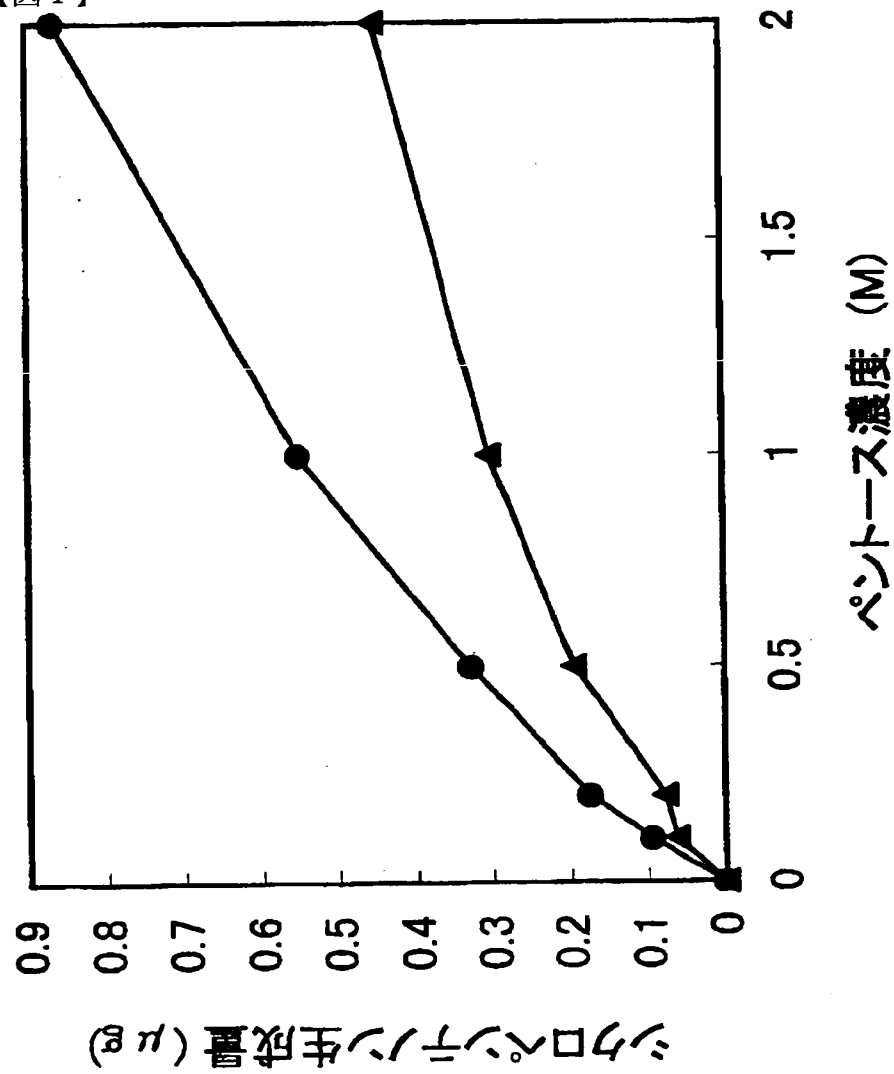
【図1】

ペントース濃度とシクロペンテノン生成量との関係を示す図である。

【書類名】 図面

1 / 1

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 制がん作用等の生理作用を有する 4, 5-ジヒドロキシー 2-シクロペンテン-1-オンの新規な製造方法を提供する。

【解決手段】 (a) ペントース、(b) ペントース含有物、(c) ペントース誘導体、及び (d) ペントース誘導体含有物から選択される少なくとも 1 種の物（但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体含有物を除く）を加熱処理する 4, 5-ジヒドロキシー 2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。ペントース誘導体の代表例には、5 位に負電荷を持ちうる基（例えばリン酸基又は硫酸基）が結合したペントース類がある。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 591038141
【住所又は居所】 京都府京都市伏見区竹中町 609 番地
【氏名又は名称】 寶酒造株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100078503
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門 1 丁目 8 番 7 号 とみたやビル 7
階 さやか特許事務所
【氏名又は名称】 中本 宏
【代理人】 申請人
【識別番号】 100087022
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門 1 丁目 8 番 7 号 とみたやビル 7
階 さやか特許事務所
【氏名又は名称】 井上 昭
【代理人】 申請人
【識別番号】 100089428
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門 1 丁目 8 番 7 号 とみたやビル 7
階 さやか特許事務所
【氏名又は名称】 吉嶺 桂

特平10-020112

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 寶酒造株式会社